

# 肺移植後閉塞性細気管支炎に対するCTLA4-Igの線維性閉塞抑制効果の検討 マウス肺内気管移植モデルを用いて

著者	鈴木 大和
号	89
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第4026号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129463">http://hdl.handle.net/10097/00129463</a>

氏 名	鈴木 大和
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	2020 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	肺移植後閉塞性細気管支炎に対する CTLA4-Ig の線維性閉塞抑制効果の検討 —マウス肺内気管移植モデルを用いて—
論文審査委員	主査 教授 岡田 克典 教授 上月 正博 教授 山家 智之

## 論文内容要旨

【背景】肺移植は終末期呼吸器疾患患者に対する有効な治療法として確立しているが、術後生存率は他の臓器移植に比較していまだ満足できるものではない。その原因の一つである慢性拒絶反応の一つのサブタイプの閉塞性細気管支炎症候群(bronchiolitis obstructive syndrome; BOS)は慢性期死亡原因の第1位であり、肺移植の成績向上のためには、効果的で副作用の少ない BOS の治療法や予防法の開発が重要である。Cytotoxic T lymphocyte antigen 4-fusion protein (CTLA4-Ig) は、活性化 T 細胞に対する抑制効果を有し、日本では未だ承認されていないが、世界的には近年腎移植の分野で CTLA4-Ig 製剤が承認され、良好な成績が報告されている。ごく最近、関節リウマチ患者において、CTLA4-Ig 製剤の投与は、制御性 T 細胞の一つのサブタイプで、T 細胞をアナジーに誘導する転写因子である early growth response gene 2 (EGR2) を高発現し抗炎症作用をもつ IL-10 を産生する LAG-3<sup>+</sup>Treg を誘導し、その治療効果を発揮している可能性があると報告された。Lymphoid neogenesis は、慢性的な炎症の過程でリンパ節などの二次リンパ器官 (secondary lymphoid organs, SLOs) と類似した構造をもつ三次リンパ器官 (tertiary lymphoid organs, TLOs) が形成される現象をさし、ヒト肺移植後の BOS の形成に深くかかわっていること、BOS の代表的なモデルの一つであるマウス肺内気管移植 (intrapulmonary tracheal transplantation; IPTT) モデルでは、lymphoid neogenesis の抑制により、移植された気管内腔の線維性閉塞が抑制されることが報告された。筆者は肺移植レシピエントにおいて、CTLA4-Ig 投与がその LAG-3<sup>+</sup>Treg 誘導効果や T 細胞の抑制効果による lymphoid neogenesis 抑制効果を介して、BOS の予防・治療効果を有すると仮定した。

【方法】慢性拒絶反応のモデルとして、マウス IPTT モデルを用いた。移植直後、術後 7 日、14 日、21 日に CTLA4-Ig 群には CTLA4-Ig を 500 µg、コントロール群には human IgG を 500 µg を腹腔内投与し、28 日目に犠牲死させた。気管内線維性閉塞の検索のため Masson trichrome (MT) 染色、TLO の検索のため hematoxylin eosin (HE) 染色、TLO の構成リンパ球を確認するため蛍光免疫染色 (B220/CD3/DAPI) を行った。気管が移植されたレシピエント肺を用いて気管内腔の膠原線維の主要な成分である 1 型コラーゲンの遺伝子である collagen type 1 alpha chain (COL1a1)、線維芽細胞を活性化させる酵素である matrix metalloproteinase 2 (MMP2)、matrix metalloproteinase 14 (MMP14)、CTLA4-Ig が LAG-3<sup>+</sup>Treg を誘導し得るか検討するため、early growth response gene 2 (EGR2)、lymphocyte activating gene 3 (LAG-3)、interleukin 10 (IL-10) さらに lymphoid neogenesis に関わるサイトカイン検討のため、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor α (TNFα)、Interferon gamma (IFNγ)、リンフォイドネオジェネシスを誘導する C-C Motif Chemokine Ligand 19 (CCL19)、C-C Motif Chemokine Ligand 21 (CCL21)、C-X-C motif

chemokine ligand 12 (CXCL12)、C-X-C motif chemokine ligand 13 (CXCL13) の mRNA の発現を定量 RT-PCR を用いて比較検討した。また気管が移植された肺、末梢血血漿、縦隔リンパ節における CD4<sup>+</sup>T 細胞における LAG-3<sup>+</sup>Treg の割合を flow cytometry (FCM) を用いて比較検討した。また、CTLA4-Ig が B 細胞の抗体産生に与える影響について検討するため、末梢血血漿中の総 IgG を測定した。

【結果】移植気管内腔の線維性閉塞率は CTLA4-Ig 群で有意に減少していた。定量 RT-PCR では COL1a1、MMP14 が CTLA4-Ig 群で有意に低値であった。MMP2 は CTLA4-Ig 群で低い傾向があったが、両群に有意な差を認めなかった。EGR2 は両群に有意な差を認めなかった。LAG-3、IL10 は CTLA4-Ig 群で有意に低値であった。FCM による CD4<sup>+</sup>T 細胞における LAG-3<sup>+</sup>Treg の割合は、気管が移植されたレシピエント肺、末梢血中、縦隔リンパ節のいずれも有意な差を認めなかった。気管周囲の TLO の大部分は B220 で染色され、B 細胞で占められておりその面積は、CTLA4-Ig 群で有意に減少していた。線形回帰分析では TLO の総面積と閉塞率には有意な正の相関が認められた。定量 RT-PCR では、TNF $\alpha$ 、CCL21、CXCL12、CXCL13 が CTLA4-Ig 群で有意に低値であった。IFN $\gamma$ 、CCL19 は CTLA4-Ig 群で低い傾向があったが両群で有意な差を認めなかった。末梢血血漿中の IgG は CTLA4-Ig 群で有意に低値であった。

【結論】CTLA4-Ig 投与がマウス IPTT モデルにおいて気管内の線維性閉塞を抑制すること、CTLA4-Ig 投与による lymphoid neogenesis の抑制がその効果に関与していることが示唆され、CTLA4-Ig はヒト肺移植後の BOS の抑制に有効である可能性が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 .....肺移植後閉塞性細気管支炎に対する CTLA4-Ig の線維性閉塞抑制効果の検討  
.....マウス肺内気管移植モデルを用いて.....

所属専攻・分野名 .....医科学専攻 .....呼吸器外科学分野.....

学籍番号 B6MD5070 .....氏名 .....鈴木 大和.....

肺移植は終末期呼吸器疾患患者に対する有効な治療法として確立し、本邦においても肺移植症例数は増加傾向にある。しかし術後生存率は他の臓器移植に比較していまだ満足できるものではない。その原因の一つである慢性拒絶反応の一つのサブタイプの閉塞性細気管支炎症候群(bronchiolitis obstructive syndrome; BOS)は慢性期死亡原因の第1位であり、肺移植の成績向上のためには、効果的で副作用の少ない BOS の治療法や予防法の開発が不可欠であり、さらなる研究が望まれる領域であった。

本研究では、肺移植後 BOS に対する CTLA4-Ig の治療効果を、BOS のモデルとして広く用いられているマウス肺内気管移植モデル (IPTT モデル)を用いて検討したものである。CTLA4-Ig は腎移植分野では既に臨床で使用され、有効性について既存の免疫抑制療法と比較して、良好な成績が報告されている。本研究結果から、IPTT モデルにおいて、CTLA4-Ig が移植気管内腔の線維性閉塞を有意に抑制することが明らかとなった。ドナーの気管をレシピエントの皮下に移植するマウス異所性気管移植モデルで CTLA4-Ig の効果を検討した報告はあったが、IPTT モデルで検討した報告はなく、本研究が初である。より肺内の免疫環境に近い IPTT モデルでその効果を証明しえたことは、ヒト肺移植においても有効である可能性が示唆されたと考えられる。またその機序には、有意な差はなかったものの、制御性 T 細胞の一種である LAG3 陽性制御性 T 細胞 (LAG3<sup>+</sup> Treg) の関与が示唆されたことも、今までの報告にはなく、LAG3<sup>+</sup> Treg を用いた新たな治療も期待できることから、新規性に富み今後発展の可能性を秘めた研究であると考えられる。また BOS の形成には、近年ドナー特異的抗体 (Donor specific antibody ; DSA)の関与が注目されており盛んに研究されている分野である。本研究では、IPTT モデルにおいて BOS の形成に DSA の関与が示唆されること、また CTLA4-Ig が DSA の産生を抑制し得ることを示唆していることも、新規性に富む研究であると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。